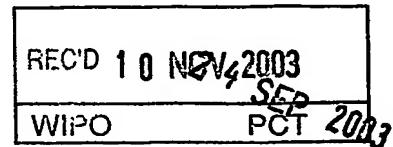


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 34 487.6

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

Anmeldetag: 29. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: EVOTEC OAI AG, Hamburg/DE

Bezeichnung: Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem

IPC: G 01 N, C 12 N, C 12 M

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 12. August 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

Remus

BEST AVAILABLE COPY

15765 Hz/hr

Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem, insbesondere Verfahren zur Partikeldetektion in fluidischen Mikrosystemen durch Impedanzmessungen, und Messeinrichtungen zur Durchführung derartiger Verfahren.

Es ist bekannt, biologische Zellen nach dem sog. Coulter-Counter-Prinzip zu zählen. Dabei werden die Zellen durch eine kleine Öffnung zwischen zwei Räumen bewegt, in denen zwei Elektroden angeordnet sind. Bei Änderung des elektrischen Widerstands zwischen den Elektroden wird eine Zelle in der Öffnung detektiert und gezählt. Dieses Prinzip wurde zunächst für makroskopische fluidische Systeme (typische Leitungsdimensionen im mm- bis cm-Bereich) entwickelt und zunehmend auch in fluidischen Mikrosystemen angewendet (WO 00/37628, S. Gawad et al. in „IEEE-EMBS Conference on Microtechnologies in Med. & Biol.“, 2000, Lyon, Frankreich, und M. Koch et al. in „J. Micromech. Microeng.“, Bd. 9, 1999, Seite 159-161).

Beispielsweise wird in WO 00/37628 ein Mikrosystem zur Zellpermeation (oder Zellfusion) beschrieben, in dem vor der Permeation eine Zelldetektion durch eine elektrische Widerstandsmessung erfolgt. Für eine größenabhängige Zellpermeation werden die Partikel unter der Wirkung negativer Dielektrophorese je nach ihrer Größe in verschiedene Teilkanäle des Mikrosystems überführt. In jedem Teilkanal werden die Partikel mit der strömenden Flüssigkeit an einem Elektrodenpaar vorbeibewegt, an dem die Widerstandsmessung erfolgt. Nachteilig an der Detektionstechnik gemäß WO 00/37628 ist, dass die Partikel in Bezug auf das jeweilige Elektrodenpaar nicht ausgerichtet werden. Eine Fokussierung ist nicht vorgesehen. Die Detektorsignale

besitzen daher eine verminderte Reproduzierbarkeit, die Detektion ist unzuverlässig.

Von Gawad et al. werden ebenfalls planare Impedanzsensoren oder Elektrodenpaare an gegenüberliegenden Wänden eines Kompartiments des Mikrosystems verwendet. Die Zellen werden zur Ausrichtung relativ zu den Sensoren durch eine Düse (z. B. Kanal mit einem Querschnitt von $20\text{ }\mu\text{m} \cdot 20\text{ }\mu\text{m}$) geführt, um ein gut auswertbares Impedanzsignal zu erhalten. Das Signal-Rausch-Verhältnis der Impedanzmethode hängt nämlich im Wesentlichen vom Verhältnis des Zellradius zum Kanalquerschnitt an einer Detektorelektrode ab (siehe Koch et al.). Nachteilig ist dabei jedoch, dass enge Düsen oder Kanäle sich durch eine vergrößerte Verstopfungsgefahr auszeichnen. Außerdem reduzieren sie den Zelldurchsatz.

Es ist ferner bekannt, die Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen unter Verwendung eines Referenzelektrodensystems durchzuführen (s. Gavad et al.). Die Impedanzmessung erfolgt üblicherweise bei mindestens einer festen Frequenz im Bereich von einigen 10 kHz bis MHz. Durch die Verwendung mehrerer Frequenzen können zusätzliche Informationen über die detektierte Zellen gewonnen werden. Bei der Einzelzellimpedanzspektroskopie erfolgt die Impedanzmessung für ein bestimmtes Frequenzspektrum (s. H. G. L. Coster et al. in „BioElectroChem. BioEnerg.“, Bd. 40, 1996, Seite 79-98).

Die Verstopfungsgefahr kann vermieden werden, wenn anstelle einer Düse eine hydrodynamische Fokussierung vorgesehen ist. Ein prinzipieller Nachteil hydrodynamischen Fokussierung besteht jedoch darin, dass Messelektroden in der Regel an einer Kanalwand angebracht sind, eine Fokussierung in den Randbereich jedoch ausgeschlossen oder nur mit großem technischen Aufwand realisierbar ist. Die hydrodynamische Fokussierung ist ferner nur begrenzt anwendbar. Sie wird insbesondere durch die System-

geometrie (geringe Kanallänge) oder geringe Pumpraten erschwert. Außerdem kommt es bei der Fokussierung zu hydrodynamischem Stress, der insbesondere bei empfindlichen biologischen Zellen unerwünscht ist.

Es sind auch andere Detektionsprinzipien bekannt, die eigenständig realisiert oder mit Impedanzmessungen kombiniert werden. Beispielsweise basieren optische Verfahren auf einer Messung der Lichtstreuung der zu detektierenden Partikel. Dies setzt jedoch die Verwendung einer bestimmten Geometrie und transparenter Wandmaterialien im Mikrosystem voraus. Bei einer magnetischen Fokussierung erfolgt eine Annäherung der Zellen an Messelektroden mit Hilfe externer Magnetfelder. Hierzu müssen jedoch an die Zellen magnetische Teilchen angekoppelt werden, die darüber hinaus nachteilig für impedanzspektroskopische Messungen sind. Auch eine thermische Fokussierung mit lokalen Heizeinrichtungen ist nachteilig, da dabei Zellen unerwünschten Temperaturänderungen ausgesetzt werden.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen, mit denen die Nachteile der herkömmlichen Detektionsverfahren überwunden werden und die insbesondere eine verbesserte Fokussierung von Partikeln in der Nähe von Detektorelektroden ermöglichen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, die Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen dahingehend weiterzuentwickeln, dass Partikel nicht nur gezählt, sondern auch weitere Informationen über die Partikel gewonnen werden. Die Aufgabe der Erfindung ist es ferner, verbesserte Messeinrichtungen zur Impedanzmessung in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden mit Verfahren und Messeinrichtungen mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1 oder 12 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Eine Grundidee der Erfindung ist es, suspendierte Partikel, die in einem Kompartiment eines fluidischen Mikrosystems mit mindestens einem Impedanzdetektor erfasst werden sollen, unter der Wirkung dielektrophoretischer Feldkräfte, die im Kompartiment wirken, in die Nähe des Impedanzdetektors zu fokussieren. Mit mindestens zwei Fokussierelektroden werden hochfrequente elektrische Felder erzeugt, unter deren Wirkung mittels negativer Dielektrophorese die Partikel relativ zu einer Flüssigkeitsströmung im Kompartiment in einen Teilbereich der Strömung bewegt und damit in vorbestimmter Weise relativ zum Impedanzdetektor positioniert werden. Die Partikel werden im Kompartiment entlang einer vorbestimmten, durch die dielektrophoretische Fokussierung definierten Trajektorie am Impedanzdetektor vorbeibewegt. Durch die erfindungsgemäße Kombination des Impedanzdetektors mit den mindestens zwei Fokussierelektroden werden vor- teilhafterweise die Nachteile herkömmlicher Fokussiertechniken überwunden. Es werden insbesondere unerwünschte Belastungen durch mechanische oder hydrodynamische Kräfte vermieden. Des Weiteren kann die dielektrophoretische Fokussierung optimal an die jeweils zu detektierenden Partikel angepasst werden.

Erfindungsgemäß erfolgt die Impedanzmessung mit mindestens einem Impedanzdetektor, der in einem von einer Flüssigkeitsströmung durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist. Das Kompartiment ist allgemein eine Leitungsstruktur im Mikrosystem, wie z. B. ein Kanal oder ein durchströmtes Reservoir. Typische Querschnittsdimensionen des Kompartiments liegen beispielsweise im Bereich von 200 μm bis 800 μm (Breite) \cdot 20 μm bis 100 μm (Höhe). Das Kompartiment ist in einem Chipkörper aus festem Material (z. B. Halbleiter, Keramik, Kunststoff oder dgl.) gebildet. Der mindestens eine Impedanzdetektor umfasst mindestens zwei Detektorelektroden, die an einer oder verschiedenen Wänden des Kompartiments angebracht sind. Die erfindungsgemäße dielektrophoretische Fokussierung von Partikeln umfasst

allgemein eine Bewegung von Partikeln in einen Teilbereich der Strömung (Strömungssegment), in dem Partikel beim Vorbeitritt am Impedanzdetektor einen vorbestimmten, vorzugsweise verminderten Abstand von einer der Detektorelektroden besitzt.

Erfindungsgemäß kann die Fokussierung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor erfolgen. Diese Ausführungsform kann wegen der getrennten Ansteuerung von Fokussier- und Detektorelektroden vorteilhaft sein. Alternativ kann die Fokussierung am Impedanzdetektor erfolgen. Dabei können sich Vorteile durch einen vereinfachten Elektrodenaufbau ergeben.

Gemäß einer ersten vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung umfasst die dielektrophoretische Fokussierung eine Bewegung in einen Teilbereich der Strömung (z. B. in die Mitte der Strömung), der auf einer Verbindungslinie zwischen zwei an gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments angeordneten Detektorelektroden liegt oder in dessen senkrechter Projektion auf eine Wand des Kompartiments mindestens eine Detektorelektrode angeordnet ist. Diese Bewegung besitzt den Vorteil, dass alle Partikel wie durch eine düsen- oder trichterförmig gebildete Feldbarriere in einem vorbestimmten Fenster an der mindestens einen Detektorelektrode vorbeitreten. Im Unterschied zu herkömmlichen Techniken erfolgt die Passage des Fensters ohne Berührung von mechanischen, festen Bauteilen und unter Vermeidung fokussierender Strömungskräfte. Damit wird vorteilhafterweise eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses (SNR) erzielt. Eine lateral versetzte Passage an der Detektorelektrode wird vermieden. Alternativ oder zusätzlich kann die dielektrophoretische Fokussierung eine Bewegung von Partikeln derart umfassen, dass sich der senkrechte Abstand eines an mindestens einer der Detektorelektroden vorbeitretenden Partikels vermindert. In diesem Fall wird der senkrechte Abstand der Partikelpassage an der Detektorelektrode in vorbestimmter Weise eingestellt.

Erfindungsgemäß erfolgt die Partikelfokussierung mit mindestens zwei Fokussierelektroden, die an einer Wand, z. B. dem Boden des Kompartiments angeordnet sind. Mit zwei Elektroden können die Partikel hin zur gegenüberliegenden Wand des Kompartiments in Detektornähe verschoben werden. Dies kann vorteilhaft sein, wenn z. B. zur Impedanzspektroskopie eine vergrößerte Messzeit (oder: verringerte Strömungsgeschwindigkeit) gewünscht ist, wie es am Rand der Strömung gegeben ist.

Alternativ können drei Fokussierelektroden verwendet werden, von denen zwei auf einer Wand des Kompartiments konvergierend, z. B. zur Bildung einer trichterförmigen Feldbarriere angeordnet sind. Die dritte Elektrode ist als Gegenelektrode auf der gegenüberliegenden Wand des Kompartiments angeordnet. Diese Ausführungsform kann von Vorteil sein, da eine 3-dimensionale Fokussierung im Kompartiment mit einer relativ geringen Elektrodenzahl erzielt wird.

Besonders bevorzugt wird die Erfindung jedoch mit zwei Fokussierelektrodenpaaren umgesetzt, die an gegenüberliegenden Seiten des Kompartiments (z. B. Boden, Deckel) angeordnet sind. Jedes Fokussierelektrodenpaar besteht aus zwei Fokussierelektroden, z. B. in Form von konvergierenden Elektrodenstreifen. Die Verwendung von zwei Fokussierelektrodenpaaren kann zur Einstellung vorbestimmter Trajektorien durch eine trichterförmige Feldbarriere von Vorteil sein.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird der mindestens eine gemessene Impedanzwert nicht nur in Bezug auf das Vorhandensein eines Partikels, sondern auch in Bezug auf die dielektrischen Eigenschaften des jeweils erfassten Partikels ausgewertet. Vorteilhafterweise können damit zusätzliche Informationen über die strömenden Partikel erhalten werden, wie z. B. Informationen über den Vitalitätszustand einer Zelle oder dgl..

Gemäß einer weiteren, vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung werden mit mindestens einem Impedanzdetektor eine Vielzahl von Impedanzwerten erfasst und deren Zeitverlauf in Bezug auf den Zeitpunkt, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts mindestens eines Partikels am Impedanzdetektor ausgewertet. Damit wird vorteilhafterweise der Anwendungsbe- reich der herkömmlichen Impedanz-Partikelzählung auf die Erfas- sung weiterer Merkmale der Partikel oder des Mikrosystems er- weitert. Wenn ein Impedanzdetektor mit einem einzelnen Detek- torelektrodenpaar verwendet wird, das sich jeweils durch eine in Bezug auf die Strömungsrichtung asymmetrische Elektrodenform auszeichnet, so ergibt sich bei einem vereinfachten Aufbau die Möglichkeit, aus dem Zeitverlauf von Impedanzwerten die genann- ten Messgrößen abzuleiten. Wenn mehrere, voneinander beabstan- det angeordnete Impedanzdetektoren verwendet werden, sind asym- metrische Elektrodenformen nicht erforderlich.

Ein Gegenstand der Erfindung ist auch eine Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit mindestens einem Impedanzdetektor, der in einem von einer Flüssigkeits- strömung durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist, und mindestens einer Fokussiereinrichtung, die mindestens mit zwei Fokussierelektroden zur Ausübung dielektrophoretischer Kräfte auf suspendierte Partikel ausgestattet ist, die durch das Kompartiment strömen. Die Bereitstellung der mindestens zwei Fokussierelektroden ermöglicht die Formung einer trichter- förmigen Feldbarriere zur Partikelfokussierung und besitzt den Vorteil einer optimalen Integrationsfähigkeit der erfindungsge- mäßigen Messeinrichtung in an sich bekannte fluidische Mikrosys- teme auf der Basis von Fluidikchips.

Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsform der Messeinrichtung umfasst die Fokussiereinrichtung mindestens zwei Paare von Fo- kussierelektroden, die im Kompartiment die trichterförmige

Feldbarriere bilden. Eine Feldbarriere wird durch eine Verteilung hochfrequenter Felder, die von den Fokussierelektroden ausgehen und dielektrophoretische Abstoßungskräfte auf die Partikel ausüben, gebildet. Eine trichterförmige Feldbarriere zeichnet sich durch eine Feldverteilung, die abgesehen von einem Feldminimum (z. B. in der Mitte des Kompartiments) Rückhaltekkräfte bildet, so dass Partikel mit der Flüssigkeitsströmung nicht vorbeitreten können und durch das Feldminimum gezwungen werden. Mit der trichterförmigen Feldbarriere können die Partikel vorteilhafterweise an einer vorbestimmten Position den Impedanzdetektor passieren.

Der Impedanzdetektor umfasst jeweils mindestens zwei Detektorelektroden, die vorzugsweise mit einer planaren Form an einer Wand oder verschiedenen, z. B. gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments angebracht ist. Wenn eine der planaren Detektorelektroden eine relativ zur Strömungsrichtung ungleichförmige Gestalt besitzt, liefert der Impedanzdetektor bei Aufnahme einer Zeitreihe von Impedanzwerten zusätzliche Informationen über die detektierten Partikel oder das Mikrosystem. Die Gestalt der Detektorelektroden wird durch deren äußere Form oder durch Strukturierungen festgelegt. Die äußere Form umfasst bspw. Dreieck-, Oval-, Rechteck- oder Kreisformen oder aus diesen zusammengesetzte Formen. Als Strukturierung ist bspw. ein Elektrodendurchbruch oder eine Passivierungsschicht auf der Elektrode vorgesehen. Alternativ kann der Impedanzdetektor an sich eine zur Strömungsrichtung ungleichförmige oder asymmetrische Gestalt besitzen, in dem die Detektorelektroden verschieden geformt oder relativ zueinander versetzt angeordnet sind. Auch bei dieser Gestaltung besitzt die Änderung der Kapazität zwischen den Detektorelektroden bei Vorbeitritt eines Partikels eine charakteristische Zeitabhängigkeit, die im Impedanzmesswert die zusätzlichen Informationen, z. B. über die Strömungsrichtung liefert.

Die Erfindung besitzt die folgenden Vorteile. Die dielektrophoretische Fokussierung ist bei Anwendung zur Detektion von Zellen besonders schonend. Die Fokussierung kann bei Wechsel der Teilchenart oder der Betriebsbedingungen leicht geändert werden. Die Messeinrichtung lässt sich mit an sich bekannten Prozessierungstechniken als Teil bekannter Fluidikchips herstellen.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Figuren 1 bis 4: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Messeinrichtungen,

Fig. 5: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Fokussierelektroden,

Fig. 6: verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäß verwendeter Detektorelektroden, und

Fig. 7: eine Kurvendarstellung eines experimentell ermittelten Impedanzverlaufs.

Die Figuren 1 bis 4 illustrieren verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer Kombinationen aus Fokussiereinrichtungen und Impedanzdetektoren, die jeweils in einem Kanal eines fluidischen Mikrosystems angeordnet sind. Fluidische Mikrosysteme, insbesondere zur Manipulierung biologischer Zellen sind an sich bekannt und werden daher mit weiteren Einzelheiten hier nicht beschrieben.

Figur 1 zeigt einen Kanal 10 des Mikrosystems in schematischer Draufsicht (a) und Seitenansicht (b). Der Kanal 10 wird durch die Seitenwände 11, 12, einen Boden 13 und eine Deckfläche 14

begrenzt. Der Abstand zwischen den Seitenflächen 11, 12 liegt vorzugsweise im Bereich von 100 μm bis 1 mm, bspw. im Bereich von 200 bis 800 μm (Breite des Kanals), während der Abstand zwischen dem Boden 13 und der Decke 14 vorzugsweise rund 5 μm bis 200 μm , z. B. 20 bis 100 μm beträgt (Höhe des Kanals). Der Kanal 10 wird von einer Flüssigkeitsströmung in Pfeilrichtung durchströmt. Die Flüssigkeitsströmung ist typischerweise eine laminare Strömung mit dem illustrierten Geschwindigkeitsprofil 15 und mit einer Strömungsgeschwindigkeit im Bereich von z. B. 20 $\mu\text{m/s}$ bis 20 mm/s. In der Flüssigkeitsströmung sind Partikel 16 suspendiert, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren detektiert werden sollen. Die Partikel 16 bewegen sich in Strömungsrichtung mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Flüssigkeit. Vor der erfindungsgemäßen Fokussierung ruhen die Partikel relativ zur Flüssigkeit.

Die Partikel 16 umfassen bspw. synthetische Partikel (z. B. Kunststoffbits) oder biologische Zellen oder Zellbestandteile oder biologisch relevante organische Makromoleküle.

Im Kanal (oder Kompartiment) 10 ist eine erfindungsgemäße Messeinrichtung 20 vorgesehen, die eine dielektrophoretische Fokussiereinrichtung 30 und einen Impedanzdetektor 40 umfasst. Die Fokussiereinrichtung 30 ist stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor 40 angeordnet. Die Seitenwände des Kanals sind zwischen der Fokussiereinrichtung 30 und dem Impedanzdetektor 40 durchgehend ohne seitliche Öffnungen.

Die Fokussiereinrichtung 30 umfasst mindestens zwei Fokussierelektroden 31, 32. Beim dargestellten Beispiel sind zwei Paare von Fokussierelektroden 31-34 vorgesehen, von denen das erste Paar 31, 32 bspw. an der Deckfläche 14 und das zweite Paar 33, 34 auf dem Boden 13 angeordnet sind. Jede Fokussierelektrode umfasst einen geraden Elektrodenstreifen, der jeweils an der Deckfläche 14 oder am Boden 13 vom Kanalrand hin zur Kanalmitte

gerichtet ist. Die Enden 35 der Fokussierelektroden sind voneinander beabstandet. Die Fokussierelektroden sind jeweils über eine Anschlussleitung (nicht dargestellt) mit einer Steuereinrichtung (mit Hochfrequenzspannungsquelle) verbunden.

Der Impedanzdetektor 40 ist in Strömungsrichtung mit einem Abstand im Bereich von 10 μm bis 2 mm von der Fokussiereinrichtung 30 angeordnet. Der Impedanzdetektor umfasst mindestens zwei Detektorelektroden 41, 42, die an der Deckfläche 14 und am Boden 13 des Kanals 10 angeordnet sind. Jede Detektorelektrode 41, 42 kann an sich aufgebaut sein, wie es von herkömmlichen Impedanzmessungen in Elektrolyten bekannt ist. Vorzugsweise besitzen sie jeweils eine planare Elektrodenfläche mit einer asymmetrischen oder ungleichförmigen Gestalt (s. unten).

Die Partikel 16 strömen mit der Flüssigkeit allgemein ungeordnet durch den Kanal 10, bis sie an die Fokussiereinrichtung 30 gelangen. An dieser wird mit den Fokussierelektroden 31-34 bei gleichförmiger Spannungsbeaufschlagung eine trichterförmige Feldbarriere gebildet, die sich in Strömungsrichtung verengt. Die Enden 35 der Fokussierelektroden 31-34 spannen ein Viereck auf, in dem sich ein Feldminimum befindet, durch das die Partikel 16 hindurchtreten können. Anschließend sind die Partikel 16 in einem Teilbereich der Strömung entsprechend der Lage des Feldminimums, z. B. in der Mitte des Kanals aufgereiht. In dieser Aufreihung passieren die Partikel die Detektorelektroden 41, 42. An diesen erfolgt die Impedanzmessung nach an sich bekannten Prinzipien.

Bei dem Aufbau gemäß Fig. 1 erfolgt mit symmetrischen Fokussierelektroden 31-34 eine Fokussierung in der vertikalen Kanalmitte, d. h. in der Mitte zwischen den Seitenflächen 11, 12. Der Teilbereich der Strömung, in dem die Partikel 16 aufgereiht sind, ist bei senkrechter Projektion auf die Boden- und Deckflächen mit den Detektorelektroden 41, 42 ausgerichtet. Es ist

nicht zwingend erforderlich, dass die Partikel 16 auch horizontal fokussiert werden, d. h. im Gleichgewicht zwischen elektrischen Feldkräften und Gewichtskraft in der Mitte zwischen den Boden- und Deckflächen 13, 14 aufgereiht werden. Dies kann allerdings ebenfalls durch die Form und/oder Höhe der Feldbarriere eingestellt werden, die mit den Fokussierelektroden 31-34 gebildet wird (siehe auch Fig. 3).

Die Fokussierung und die Detektion erfolgen jeweils unter Verwendung von Hochfrequenzspannungen. Es gehört zu den wichtigen und unerwarteten Erkenntnissen der Erfinder, dass eine ggf. störende, gegenseitigen Beeinflussung von Fokussierung und Detektion vermieden werden kann. Hierzu erfolgen die Fokussierung des mindestens einen Partikels und die Messung des mindestens einen Impedanzwertes bei verschiedenen Frequenzen. Es werden beispielsweise verschiedene (getrennte) Frequenzbereiche verwendet. Zellschonendes Fokussieren kann durch Verwendung einer Fokussierfrequenz oberhalb einiger 100 kHz erzielt werden. Für die Impedanzmessung ist dieser Bereich auszuschließen. Vorzugsweise erfolgt die Impedanzmessung bei einer Frequenz unterhalb von z.B. 100 kHz. Die Impedanzmessung kann alternativ bei höheren Frequenzen erfolgen (z. B. 1 MHz), um Informationen über den Innenraum der Partikel, z. B. den Elektrolytgehalt in Zellen zu erhalten. Entsprechend würden die Fokussierelektroden bei noch höheren oder ggf. bei niedrigeren Frequenzen betrieben werden. Alternativ oder für eine weitere Entkopplung zwischen Fokussierung und Detektion kann der Impedanzdetektor 40 mit einem Frequenzfilter, z. B. einem Tief- oder Bandpassfilter ausgestattet sein. Mit dem Frequenzfilter werden die Frequenzen von der Detektion ausgenommen, bei denen die Fokussierelektroden betrieben werden.

Die Wechselwirkung zwischen Fokussiereinrichtung 30 und Impedanzdetektor 40 kann auch durch Erhöhung des gegenseitigen Abstandes in Strömungsrichtung vermindert werden. Dies ist vor-

teilhafterweise durch die Laminarität der Strömung im Kanal 10 möglich. Der Abstand kann bspw. auch bis zu 3 mm erhöht werden.

Der Impedanzdetektor 40 kann gemäß der Draufsicht in Fig. 2 aus mehreren verschiedenen Detektorelektroden 41, 42 und 43 aufgebaut sein. Auf den Boden- und Deckflächen 13, 14 ist ein Detektorelektrodenpaar aus zwei relativ großflächigen Detektorelektroden 41, 42 vorgesehen. Beide Detektorelektroden 41, 42 besitzen die gleiche Außenform. In der schematischen Draufsicht ist lediglich die obere Elektrode 42 vollständig dargestellt. Im unteren Teil von Fig. 2 ist zu Illustrationszwecken die untere Elektrode 41 gezeigt. In die obere Detektorelektrode 42 ist eine dritte Detektorelektrode 43 integriert. Sie ist in einer Ausnehmung der Elektrodenfläche der oberen Elektrode 42 mit Abstand von dieser angeordnet. Durch den Abstand ist teilweise die untere Elektrode 41 erkennbar. Beispielsweise besitzen die größeren Detektorelektroden 41, 42 Dimensionen von rd. $120 \cdot 150 \mu\text{m}$, während die einzelne, kleinere Detektorelektrode 43 eine Größe entsprechend typischen Zellgrößen in der Biologie von z. B. $20 \mu\text{m}$ besitzt.

Die drei Detektorelektroden 41-43 gemäß Fig. 2 sind vorzugsweise nach dem in Fig. 3 illustrierten Prinzip geschaltet. Die untere Detektorelektrode 41 wird mit einer Treiberspannung mit einer vorbestimmten Messfrequenz beaufschlagt (z. B. $U < 1 \text{ V}$, $f = 50 \text{ kHz}$). Die obere Detektorelektrode 42 liegt auf Massepotential. Zwischen der oberen Detektorelektrode 42 und der dritten Detektorelektrode 43 ist ein elektrischer Widerstand R angeordnet, der entsprechend dem Widerstand der im Kompartiment strömenden Flüssigkeit dimensioniert ist. Die Messspannung U wird an der dritten Elektrode 43 gegenüber Massepotential abgenommen. Die erfindungsgemäße Impedanzmessung erfolgt derart, dass laufend die Spannung U erfasst und die Impedanz ermittelt wird. Sobald sich ein Partikel über der dritten Elektrode 43 befindet, wird diese abgeschirmt, so dass die Spannung U steigt.

Ein Vorteil der in den Fign. 2 und 3 illustrierten Ausführungsform der Erfindung besteht in der Möglichkeit, die Partikel mit einer hohen Genauigkeit über die kleine, dritte Elektrode 43 zu führen. Durch die dielektrophoretische Fokussierung wird anstelle der herkömmlichen Coulter-Düse ein "virtuelles" Fenster erzeugt, das präzise in Bezug auf die dritte Elektrode 43 ausgerichtet ist. Dadurch kann ein besonders hohes Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

In den Figuren 4a (Draufsicht) und 4b (Seitenansicht) ist schematisch die horizontale Fokussierung illustriert. Bei dieser Ausführungsform umfasst der Impedanzdetektor 40 ein Detektorelektrodenpaar 44, das nur auf der Deckfläche 14 angeordnet ist. Als Fokussiereinrichtung 30 werden zwei Paare von Fokussierelektroden 31, 32 und 33, 34 verwendet, von denen die unteren Fokussierelektroden 33, 34 in Strömungsrichtung um eine Strecke dx länger ausgebildet sind, als die oberen Fokussierelektroden 31, 32. Dadurch wird die Feldbarriere verzerrt, das Feldminimum wird von der Kanalmitte hin zur Deckfläche 14 verschoben, so dass die Partikel 16 in einen Teilbereich der Strömung fokussiert werden, der nahe dem Detektorelektrodenpaar 44 ist. Der geringste Abstand der Partikel 16 vom Detektorelektrodenpaar 44 beträgt bspw. 1 μm .

Erfindungsgemäß kann die Messeinrichtung zusätzlich mit einer Defokussiereinrichtung 50 ausgestattet sein, die im rechten Teil der Figuren 4a und 4b schematisch illustriert ist. Die Defokussiereinrichtung 50 besitzt die Aufgabe, die Partikel nach der Messung wieder im gesamten Strömungsprofil zu verteilen, oder im Bereich der größten Strömungsgeschwindigkeit anzureichern. Damit kann vorteilhafterweise die Adhäsionswahrscheinlichkeit der Partikel untereinander (insbesondere von biologischen Zellen) verringert und der Durchsatz erhöht werden. Die Defokussiereinrichtung 50 umfasst Defokussierelektroden 51 bis

54, die analog zu den oben genannten Prinzipien eine Verschiebung der Partikel in der Flüssigkeit durch negative Dielektrophorese bewirken.

Die Fokussier- oder Defokussierelektroden einer erfindungsgemäßen Messeinrichtung sind vorzugsweise als Elektrodenstreifen mit einer Anordnung entsprechend der gewünschten Feldbarriere gebildet. Abweichend von den oben beschriebenen Ausführungsformen können die Elektrodenstreifen in der jeweiligen Wandebene (z. B. in der Bodenfläche) gekrümmt sein, wie dies im Teilbild a der Fig. 5 illustriert ist. An die konvergierenden Elektrodenabschnitte 35, 36 schließen sich 2 gerade, parallele Elektrodenabschnitte 37, 38 an. Die Ausbildung gerader, paralleler Elektrodenabschnitte an den in Strömungsrichtung gelegenen Enden der Fokussierelektroden kann in Bezug auf die Wirksamkeit der Feldbarriere vorteilhaft sein.

In den Teilbildern b und c sind Ausführungsformen von Fokussierelektroden gezeigt, die aus drei Teilelektroden bestehen. Gemäß Fig. 5b bspw. sind die Fokussierelektroden 31, 32 an der Deckfläche eines Kompartiments angeordnet, während die fokussierende Gegenelektrode 39 auf der Bodenfläche angeordnet ist. Vorteilhafterweise kann mit dieser Anordnung eine dreidimensionale Fokussierung im Kompartiment mit nur drei Elektroden erzielt werden. Die Feldbarriere wird bspw. durch Anlegen hochfrequenter Wechselspannungen mit einer jeweils versetzten Phasenlage erzeugt. Die Phasenlage beträgt bspw.: 31: 0° , 32: 120° , 39: 240° oder: 31: 0° , 32: 180° , 39: Massepotential. Die Anordnung gemäß Fig. 5b ist mit den Fokussierelektrodenformen gemäß Fig. 5a modifizierbar (siehe Fig. 5c).

Gemäß einer alternativen Ausführungsform der Erfindung kann die Anordnung von Fokussierelektroden gleichzeitig als Detektoreinrichtung verwendet werden. Hierzu werden die Elektrodenstreifen zur Erzeugung einer trichterförmigen Feldbarriere konvergierend

so zusammengeführt, dass die Elektroden spitzen in Strömungsrichtung einen geringen Abstand besitzen, der etwa der Kanalhöhe entspricht. Die Fokussierelektroden (z. B. gemäß Fig. 1) werden mit Hochfrequenzspannungen zur Fokussierung beaufschlagt. Die Impedanz wird diagonal, also bspw. zwischen den Elektroden 31 und 34 oder 32 und 33 gemessen. Bei einer Gestaltung gemäß den Fign. 5b oder 5c kann die Impedanzmessung zwischen einer der Elektroden 31, 32 und der Gegenelektrode 39 erfolgen.

Bei der Passage eines Partikels an einem Impedanzdetektor hängt das gemessene Impedanzsignal neben den dielektrischen Eigenschaften (insbesondere Dielektrizitätskonstante, Leitfähigkeit) des Partikels und der Suspensionslösung auch vom Volumenanteil des Partikels zwischen den Messelektroden ab. Wenn die Messelektroden relativ zur Strömungsrichtung ungleichförmig oder asymmetrisch aufgebaut sind, wie dies beispielhaft in Fig. 6 illustriert ist, wird bei der Partikelpassage mit einer konstanten Strömungsgeschwindigkeit ein im Zeitverlauf ungleichförmiges Impedanzsignal gemessen. Das Impedanzsignal ist im Bezug auf das Maximum asymmetrisch. Aus dem Kurvenverlauf kann neben der Strömungsgeschwindigkeit auch die Strömungsrichtung bestimmt werden (s. Fig. 7). Zur Bereitstellung ungleichförmiger oder asymmetrischer Messelektroden erhalten diese eine bestimmte Elektrodenform und/oder eine Elektrodenstrukturierung. Die Elektrodenstrukturierung umfasst bspw. Durchbrüche oder Löcher in der Elektrodenfläche. Alternativ können auch Passivierungen durch Passivierungsschichten auf der Elektrodenfläche vorgesehen sein. Die Figuren 6a und 6b zeigen beispielhaft Elektrodenflächen 44 mit kreisförmigen Durchbrüchen 45 (oder Passivierungsschichten). Eine asymmetrische Elektrodenfläche eines erfindungsgemäßen Impedanzdetektors ist gegeben, wenn die wirksame Elektrodenfläche sich in Strömungsrichtung verändert. Dies ist hier bspw. durch die Aneinanderreihung der Durchbrüche 45 gegeben. Alternativ kann die Variation der Elektrodenfläche

gemäß den Figuren 6c bis 6f auch durch Veränderungen der äußeren Gestalt bereitgestellt werden. Die Umrandung der Elektrodenfläche zeichnet sich durch mindestens eine Dreieck-, Rechteck-, Oval- oder Kreisstruktur aus.

Die Messelektroden bestehen aus einem inerten, leitfähigen Material, insbesondere Metall, wie z. B. Platin oder Gold. Die Passivierungsschichten bestehen aus einem isolierenden Material, z. B. Siliziumoxid.

Figur 7 zeigt beispielhaft den Zeitverlauf eines Impedanzsignals, das mit einem asymmetrischen Impedanzdetektor gemäß Fig. 2 aufgenommen wurde. Der Kurvenverlauf zeigt das Impedanzsignal (willkürliche Einheiten) in Abhängigkeit von der Zeit. Die oben eingezeichneten Kreise markieren Partikeldurchgänge, die durch eine Videokontrolle ermittelt wurden. Bei jedem Partikeldurchgang zeigt die Impedanzkurve eine charakteristische Asymmetrie relativ zum jeweiligen Maximum. Auf beiden Seiten eines Maximums sind zwei Nebenmaxima (Schultern) messbar, von denen die im Zeitverlauf zweite Schulter eine geringere Amplitude besitzt als die erste Schulter. Daraus lässt sich die Strömungsrichtung ableiten: Aus dem Abstand dt zwischen den Minima jeweils zwischen einer Schulter und dem Maximum kann des Weiteren die Strömungsgeschwindigkeit abgeleitet werden, da dt der Durchgangszeit der Partikel entspricht und die Größe der Messelektrode bekannt ist.

Alternativ zu der asymmetrischen Elektrodenform gemäß Fig. 2 oder Fig. 6 lassen sich die in Fig. 7 gezeigten Merkmale auch durch Kombinationen mehrerer, in Strömungsrichtung voneinander beabstandeter Messmethoden erfassen.

Die erfindungsgemäße Impedanzmessung kann wie folgt modifiziert werden. Die Fokussierelektroden können strukturiert werden, wie dies aus der Mikrosystemtechnik zur Bereitstellung vorbestimm-

ter Feldbarrierenverläufe an sich bekannt ist. Die fokussierenden Feldbarrieren können auch durch Steuerung der Spannung und/oder Phase der hochfrequenten elektrischen Felder in der Fokussiereinrichtung modifiziert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit einem Kompartiment, das von einer Strömung einer Flüssigkeit mit mindestens einem suspendierten Partikel durchsetzt wird und in dem mindestens ein Impedanzdetektor angeordnet ist, mit dem zur Detektion des mindestens einen Partikels mindestens ein Impedanzwert erfasst wird, der für die Impedanz des Kompartiments charakteristisch ist und der sich bei Anwesenheit des mindestens einen Partikels in vorbestimmter Weise ändert, wobei eine Fokussierung des mindestens einen Partikels in einen vorbestimmten Abstand relativ zum Impedanzdetektor erfolgt,

dadurch gekennzeichnet, dass

die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels relativ zur im Kompartiment strömenden Flüssigkeit durch dielektrophoretische Kräfte umfasst, die mit mindestens zwei Fokussierelektroden ausgeübt werden.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Fokussierung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die Fokussierung am Impedanzdetektor erfolgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels in einen Teilbereich der strömenden Flüssigkeit umfasst, in dessen senkrechter Projektion auf eine Wand des Kompartiments der Impedanzdetektor angeordnet ist.

5. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Parti-

kels derart umfasst, dass sich der senkrechte Abstand des Partikels vom Impedanzdetektor verringert.

6. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem synthetische oder biologische Partikel an dem Impedanzdetektor vorbeitreten.

7. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem der mindestens eine Impedanzwert in Bezug auf dielektrische Eigenschaften des jeweils vorbeitretenden Partikels ausgewertet wird.

8. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vielzahl von Impedanzwerten erfasst wird, deren Zeitverlauf in Bezug auf den Zeitpunkt, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts des Partikels ausgewertet werden.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem aus dem Zeitverlauf der Impedanzwerte eine Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigkeit erfasst wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8 oder 9, bei dem die Impedanzwerte mit dem Impedanzdetektor und mindestens einem weiteren, in Strömungsrichtung beabstandet angeordneten Impedanzdetektor erfasst werden.

11. Verfahren gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Fokussierung des mindestens einen Partikels und die Messung des mindestens einen Impedanzwertes bei verschiedenen Frequenzen erfolgen.

12. Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem, mit:

- einem Impedanzdetektor, der in einem von einer strömenden Flüssigkeit durchsetzten Kompartiment des Mikrosystems angeordnet ist, und
- einer Fokussiereinrichtung, mit der der mindestens eine Partikel in die Nähe des Impedanzdetektors verschiebbar ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Fokussiereinrichtung mindestens zwei Fokussierelektroden zur Ausübung dielektrophoretischer Kräfte auf das mindestens eine Partikel umfasst, wobei die Fokussiereinrichtung eine trichterförmige Feldbarriere im Kompartiment bildet.

13. Messeinrichtung gemäß Anspruch 12, bei der die Fokussiereinrichtung stromaufwärts relativ zum Impedanzdetektor angeordnet ist.

14. Messeinrichtung gemäß Anspruch 12, bei der der Impedanzdetektor Teil der Fokussiereinrichtung ist.

15. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 14, bei der mindestens zwei Paare von Fokussierelektroden auf gegenüberliegenden Wänden des Kompartiments vorgesehen sind, die die trichterförmige Feldbarriere bilden.

16. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 15, bei der die Fokussierelektroden in Strömungsrichtung verschiedene Längen besitzen.

17. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 16, bei der der Impedanzdetektor mindestens zwei Detektorelektroden umfasst, die an einer Wand oder verschiedenen Wänden des Kompartiments angeordnet sind.

18. Messeinrichtung gemäß Anspruch 17, bei der mindestens eine der Detektorelektroden eine relativ zur Strömungsrichtung un-

gleichförmige Gestaltung besitzt oder beide Detektorelektroden relativ zur Strömungsrichtung verschiedene Formen aufweisen.

19. Messeinrichtung gemäß Anspruch 18, bei der die mindestens eine Detektorelektrode eine Gestaltung besitzt, die

- mindestens ein Dreieck,
- mindestens eine Streifen-Fläche-Kombination, und/oder
- mindestens eine Elektrodenstrukturierung umfasst.

20. Messeinrichtung gemäß Anspruch 19, bei der die mindestens eine Elektrodenstrukturierung einen Elektrodendurchbruch oder eine Elektrodenpassivierungsschicht umfasst.

21. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 20, bei der mindestens ein weiterer, in Strömungsrichtung beabstandet angeordneter Impedanzdetektor vorgesehen ist.

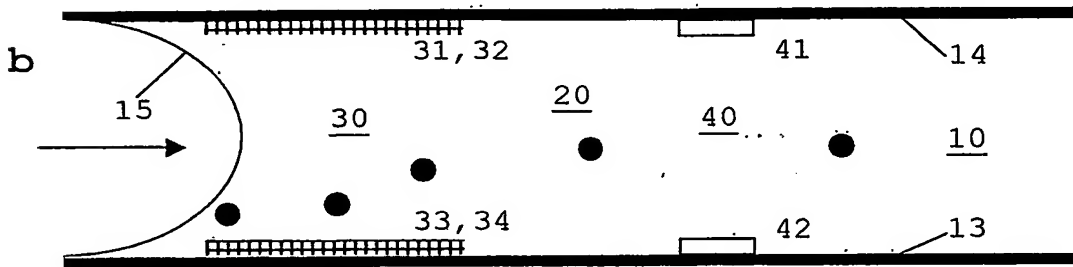
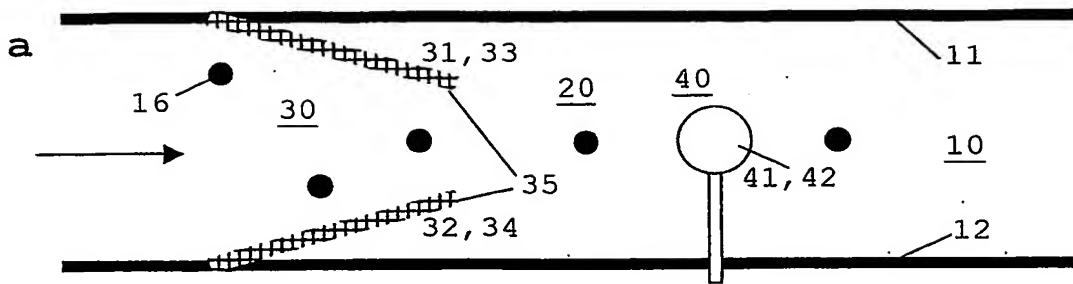
22. Messeinrichtung gemäß einem der Ansprüche 12 bis 21, bei der mindestens eine Impedanzdetektor mit einem Frequenzfilter ausgestattet ist, mit dem Frequenzen, bei denen die Fokussiereinrichtung betrieben wird, filterbar sind.

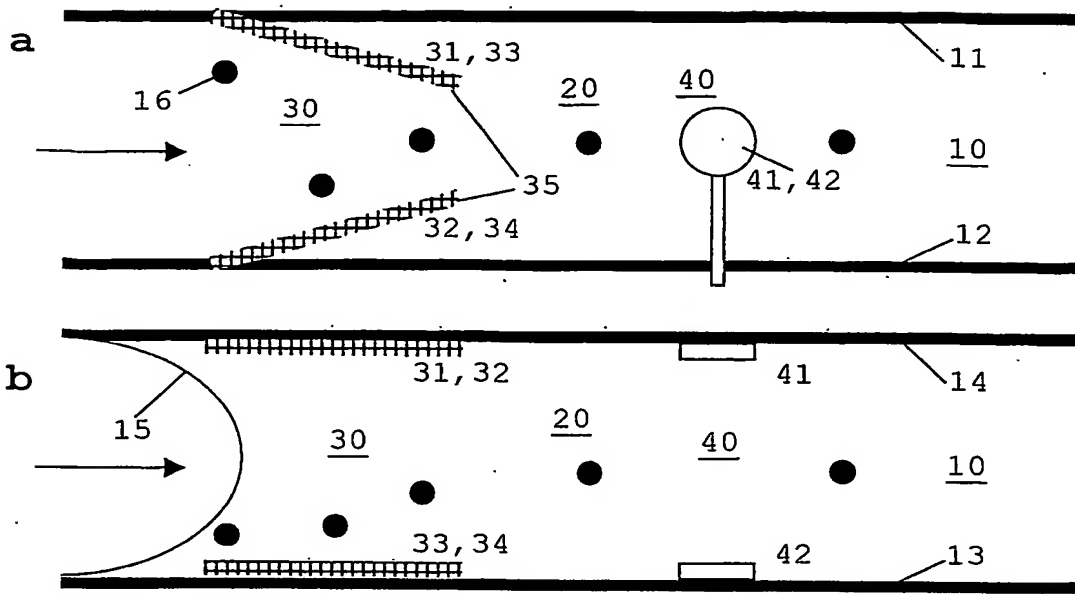
15765 Hz/hr

Zusammenfassung

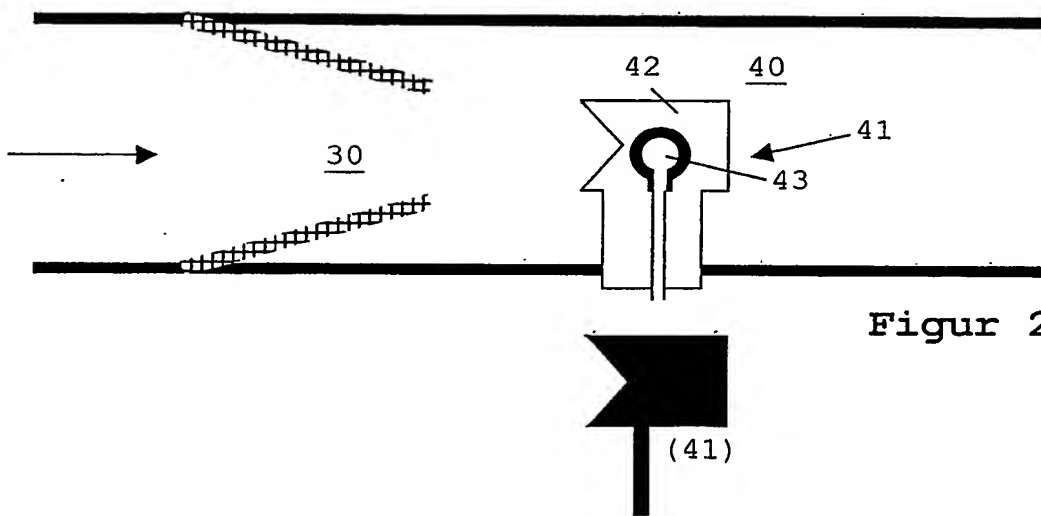
Es werden ein Verfahren und eine Messeinrichtung zur Impedanzmessung in einem fluidischen Mikrosystem mit einem Kompartiment (10) beschrieben, das von einer Strömung einer Flüssigkeit mit mindestens einem suspendierten Partikel (16) durchsetzt wird und in dem mindestens ein Impedanzdetektor (40) angeordnet ist, mit dem zur Detektion des mindestens einen Partikels mindestens ein Impedanzwert erfasst wird, der für die Impedanz des Kompartiments charakteristisch ist und der sich bei Anwesenheit des mindestens einen Partikels in vorbestimmter Weise ändert, wobei eine Fokussierung des mindestens einen Partikels in einen vorbestimmten Abstand relativ zum Impedanzdetektor erfolgt, wobei die Fokussierung eine Bewegung des mindestens einen Partikels relativ zur im Kompartiment strömenden Flüssigkeit durch dielektrophoretische Kräfte umfasst, die mit mindestens zwei Fokussierelektroden (30) ausgeübt werden.

Fig. 1

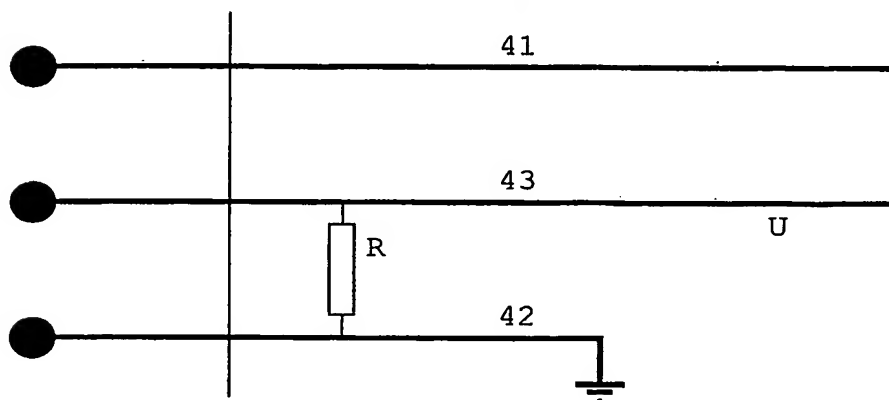




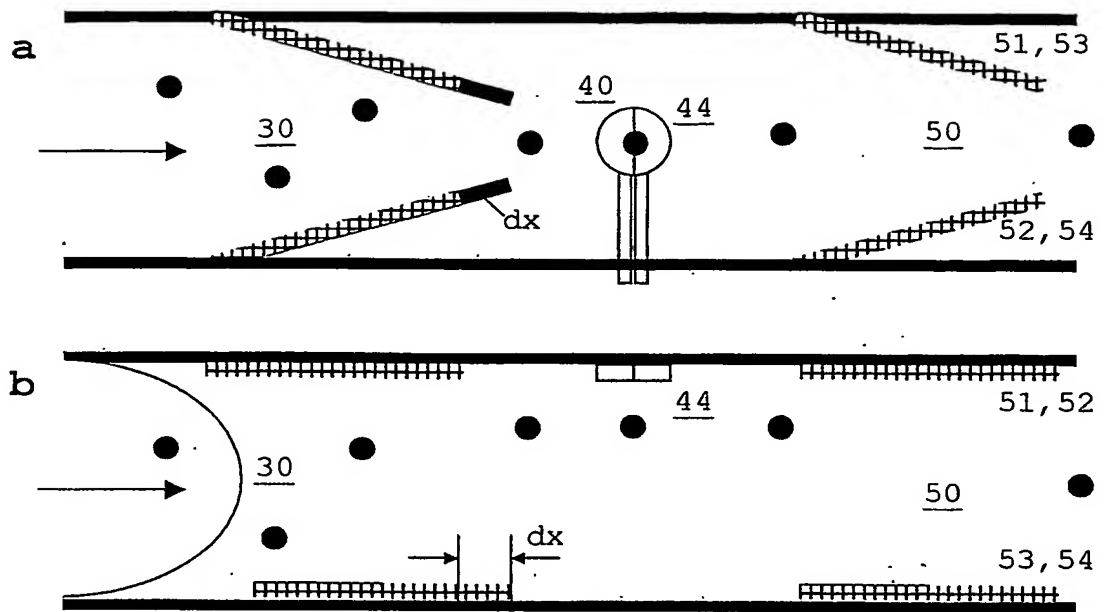
Figur 1



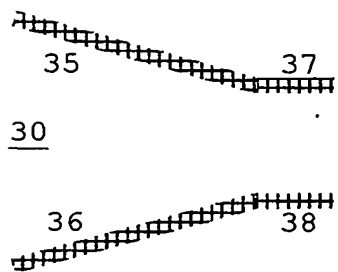
Figur 2



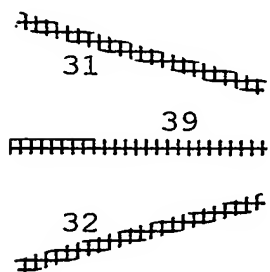
Figur 3



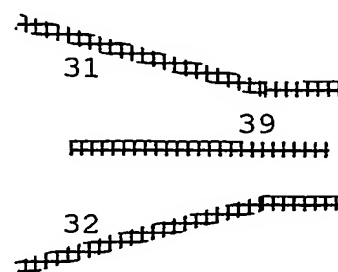
Figur 4



a

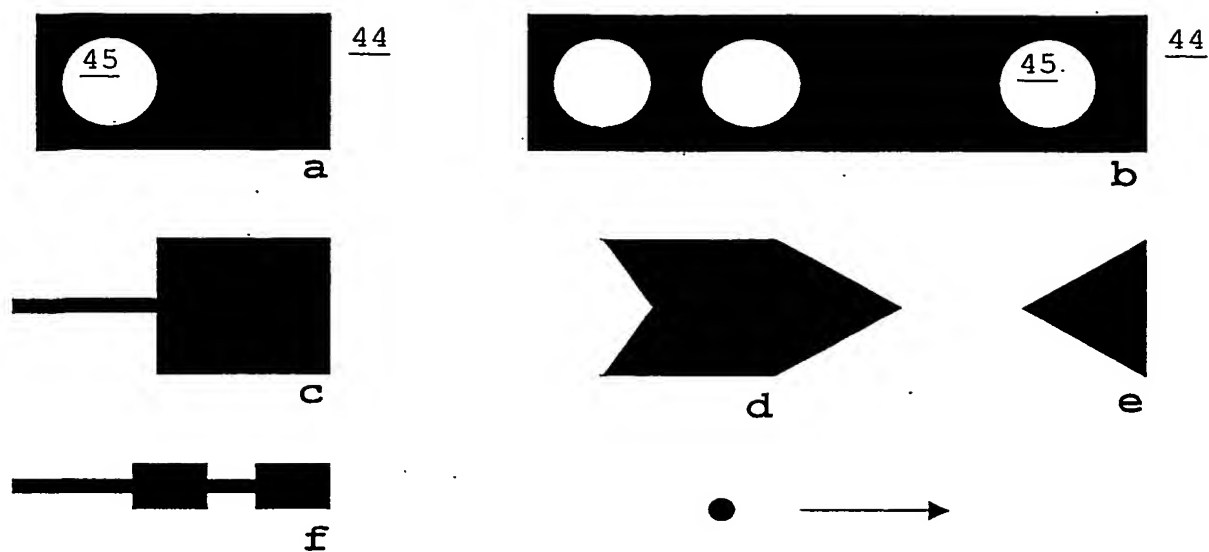


b

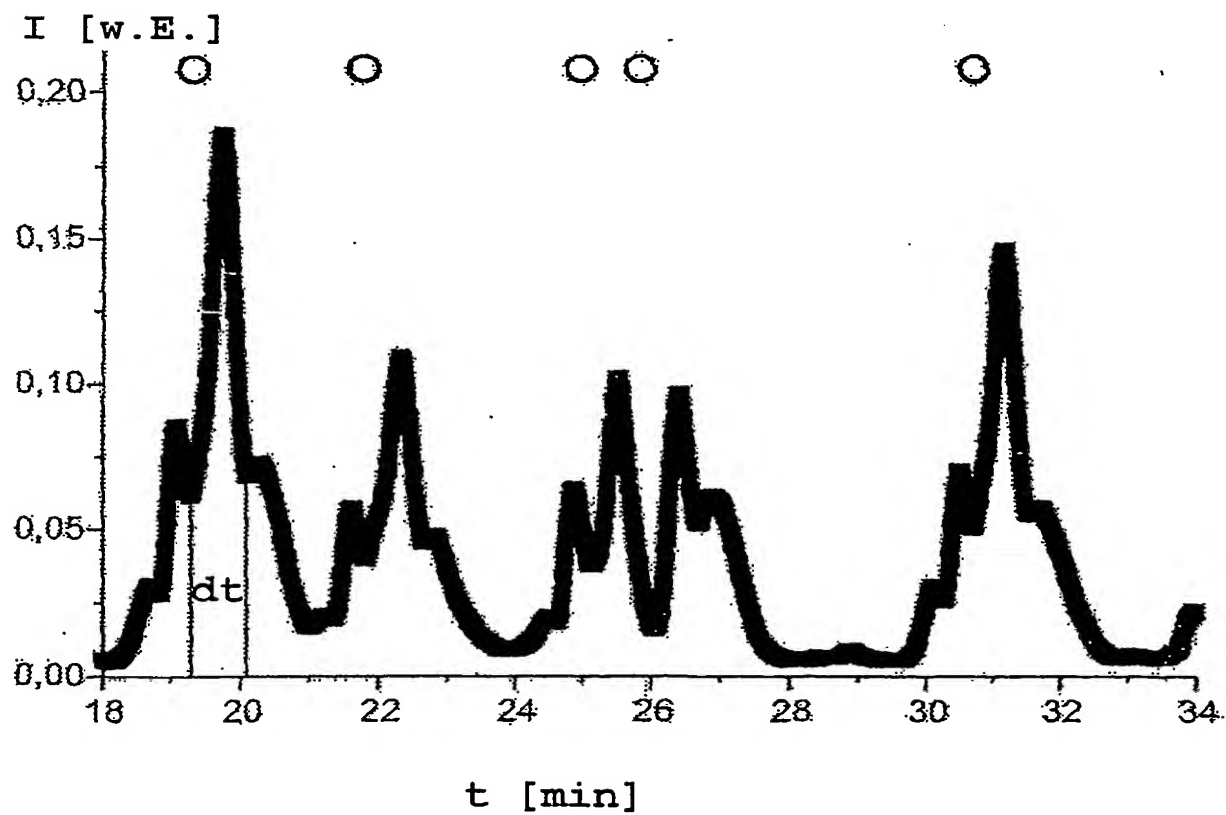


c

Figur 5



Figur 6



Figur 7

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.